

УДК 618.14:618.132-071.4-036.1-008.6:618.112-097

Дубоссарская З.М., Грек Л.П.

Днепропетровская медицинская академия Министерства здравоохранения Украины, Днепр, Украина

Dubossarskaya Z., Grek L.

Dnepropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine, Dnipro, Ukraine

Взаимосвязь молекулярно-биологических нарушений в эутопическом эндометрии и субъективной оценки боли у пациенток с генитальным эндометриозом

Correlation between molecular-biological disorders of eutopic endometrium and subjective evaluation of pain in patients with genital endometriosis

Резюме

Несмотря на большой перечень научных работ по синдрому хронической тазовой боли (СХТБ), остается неопределенной роль патоморфологических изменений в эутопическом эндометрии для его развития. Цель исследования – оценить наличие связей между морфологическими, иммуногистохимическими маркерами пролиферации, рецепторами эстрогенов и прогестерона, показателями и уровнем боли по ВАШ. Во всех исследуемых случаях определялся аденомиоз в сочетании с доброкачественными заболеваниями органов малого таза (лейомиома матки, гиперплазия эндометрия). Сравнительный анализ подгрупп позволил определить некоторые тенденции и обнаружил статистически достоверные зависимости ($p < 0,05$), что обуславливает необходимость дальнейшего продолжения исследований с целью определения статистически значимых предикторных критериев формирования СХТБ.

Ключевые слова: эутопический эндометрий, синдром хронической тазовой боли, иммуногистохимические маркеры пролиферации, рецепторы стероидных гормонов.

Abstract

Chronic pelvic pain syndrome is one of the most frequent pathologies that reduce the quality of woman's life. The main cause of it is gynecological diseases (adenomyosis, uterine leiomyoma). However, the role of morphological changes in the endometrium in the development of these diseases is still unexplored.

Objective. To assess the links between morphological and immunohistochemical markers of proliferation, estrogen and progesterone receptors, the indices and level of pain, according to VAS.

Methods. Thirty samples were divided, according to expression of the investigated marker in the glands and stroma.

Results. We observed heterogeneous expression of ER and PGR, more important role of high level of expression of PRG in the stroma, increased proliferative activity in the glands is focal in the majority of cases.

Conclusion. Formation of the CPP and adenomyosis is associated with hyperplastic processes of endometrium and increased proliferative activity ($p < 0.05$).

Keywords: eutopic endometrium, chronic pelvic pain syndrome, immunohistochemical markers of proliferation, estrogen and progesterone receptors.

■ ВВЕДЕНИЕ

Основные патогенетические звенья генитального эндометриоза (ГЭ) тесно взаимосвязаны между собой и кроме ретроградной менструации включают чрезмерную локальную продукцию эстрогенов, резистентность к прогестерону, воспаление и неоангиогенез, что не позволяет подавлять патологический процесс на начальных стадиях заболевания и объясняет инвазию в окружающие ткани с их последующей деструкцией [1]. В патогенезе боли у пациенток с ГЭ определенную роль играет дисбаланс стероидных гормонов, возникающий на тканевом уровне. Свидетельством этого является то, что при локальном синтезе эстрогенов создаются условия не системного, а тканевого дисбаланса гормонов, со смещением акцента в сторону пролиферативных и воспалительных реакций [2, 3]. К причинам возникновения хронической тазовой боли (ХТБ) при ГЭ относят изменения активности местных нервных рецепторов их длительную компрессию и повреждение в результате инвазии эктопического эндометрия и формирования очага воспаления. Такой очаг является следствием повышения концентрации стероидных гормонов, который увеличивает пролиферацию клеток, а следовательно, механическое воздействие и синтез медиаторов воспаления. Однако опубликованные данные также отмечают значение морфофункционального состояния эутопического эндометрия для формирования именно центральной сенситизации, которая уже может быть не связана с периферическими стимулами [4–6]. Основанием для изменения точки зрения стало определение в небольшом числе случаев периферической хронической травматизации (травма, воспаление, инфекции) как причины изменений в коре головного мозга [10].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для уточнения механизма развития синдрома хронической тазовой боли (СХТБ) у пациенток с ГЭ провести сравнительную оценку молекулярно-биологических особенностей эутопического эндометрия путем определения экспрессии рецепторов эстрогенов (ER) и прогестерона (PGR), факторов пролиферации (Ki-67) иммуногистохимическим методом.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 120 женщин с ГЭ в сочетании с доброкачественными заболеваниями органов малого таза (лейомиома матки, гиперплазия эндометрия) в различных сочетаниях, которые находились на лечении в гинекологическом отделении КУ «Днепропетровское клиническое объединение скорой медицинской помощи» Днепропетровского областного совета, что является клинической базой кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии ФПО ГУ «Днепропетровской медицинской академии Минздрава Украины».

Проведено: общеклинические, бактериологические, бактериоскопические исследования выделений из влагалища, уретры и цервикального канала; кольпоскопия, цитограмма на атипичные клетки; дополнительные обследования на инфекции, передающиеся половым путем (ИППП).

Морфологический анализ включал гистологическое исследование микропрепаратов эутопического эндометрия (ЭЭ), окрашенных по стандартной методике гематоксилином и эозином, и иммуногистохимическое исследование (на срезах толщиной 4 мкм согласно протоколам компании-производителя ThermoScientific (TS) (США) с использованием системы визуализации Quanto и DAB Chromogen). Оценка гистологического строения и полученных иммуногистохимических реакций проводилась с помощью микроскопа LeicaDM 2000 при увеличении 100х, 400х, 1000х. Для маркеров ER ab-1 (клон sp-1, TS, разведение 1:200), PGR (клон YR85, TS, разведение 1:200), Ki-67 (клон sp6, TS, разведение 1:250) как специфическая реакция расценивалась коричневая ядерная окраска, характер экспрессии иммуногистохимических маркеров анализировался полуколичественным методом. Для Ki-67 подсчитывался процент клеток со специфическим окрашиванием из 100 клеток в не менее чем 10 полях зрения при увеличении 400х. Для маркеров ER, PGR, учитывая процент положительных клеток и степень интенсивности их окрашивания (слабый (коэффициент (k) – 1), умеренный (k=2), выраженный (k=3)), рассчитывался индекс H-score по формуле $[1 \times (\% \text{ клеток с } k=1) + 2 \times (\% \text{ клеток с } k=2) + 3 \times (\% \text{ клеток с } k=3)]$. По полученным индексам случаи были разделены на группу с низкой ($1+ = 100 > H > 0$), умеренной ($2+ 200 > H > 101$) и выраженной ($3+ 300 > H > 201$) экспрессией.

Эхографию органов малого таза проводили аппаратом Toshiba, Nemio17-pro. С целью объективизации болевого синдрома использовали 10-балльную визуальную аналоговую шкалу (ВАШ).

В ходе клинического обследования пациенты были разделены на 3 группы, в зависимости от наличия и интенсивности тазовой боли. Первую клиническую группу составили 45 женщин с хронической тазовой болью (ХТБ), оцененной по ВАШ 7–10 баллов, вторую клиническую группу составили 40 пациенток с ХТБ умеренной интенсивности по ВАШ 4–6 баллов. В зависимости от продолжительности тазовой боли первые 2 группы разделены на подгруппы: с длительностью болевого анамнеза более 2 лет – подгруппы 1-А и 2-А; и с продолжительностью ХТБ более 6 лет – подгруппы 1-В и 2-В. Третью клиническую группу составили 35 женщин с безболевым вариантом заболевания, оценка по ВАШ составила 0–3 балла (табл. 1).

При детальном обследовании пациентов выявлены характерные клинико-анамнестические и диагностические особенности. Основным показанием для обращения за специализированной помощью пациенток 1-й группы явился выраженный болевой синдром (7–10 баллов), средняя величина болевого синдрома составила $7,8 \pm 0,7$ балла в подгруппе 1-А и $8,2 \pm 0,2$ в подгруппе 1-В у 45 пациенток; средняя величина умеренно выраженного СХТБ (4–6 баллов) в подгруппе 2-А составила $5,4 \pm 0,1$ и соответственно $5,3 \pm 0,3$ балла в подгруппе 2-В. Третью клиническую группу составили пациентки с безболевым вариантом ГЭ в сочетании с лейомиомой матки, гиперплазией эндометрия, аномальными маточными кровотечениями (АМК) в различных сочетаниях.

Таблица 1

Распределение пациенток на клинические группы в зависимости от ВАШ и длительности СХТБ

Показатель	Клинические группы (n=120)				
	1-A (n=25)	1-B (n=20)	2-A (n=20)	2-B (n=20)	3 (n=35)
Уровень ВАШ (баллы)	7–9 (высокий)	7–10 (высокий)	4–6 (умеренный)	4–6 (умеренный)	0–3 (низкий)
Среднее значение	7,8±0,7	8,2±0,2	5,4±0,1	5,3±0,3	2,2±0,3
Длительность СХТБ (годы)	1–3	4–6	1–3	4–6	–
Среднее значение	2,5±0,7	6,1±0,3	2,3±0,3	6,1±1,4	–

Наиболее характерными жалобами для пациенток 1-й и 2-й группы были боли в нижних отделах живота с иррадиацией в прямую кишку (85%), диспареуния (75%), дисменорея (80%), АМК (65%), дизурия (46%) и дисхезия (36%), более тяжелое нарушение психоэмоционального фона. Пациентам 1-B подгруппы было свойственно сочетание 5 и более клинических симптомов, более выраженных, с ранними проявлениями и быстро прогрессирующим течением, что согласуется с данными, описанными в литературе. Так, по мнению зарубежных исследователей [7, 9], наблюдается специфический комплекс висцеральных проявлений со стороны органов брюшной полости: тазовая боль (не связанная с менструацией); боли при мочеиспускании (дизурия); боль при дефекации (дисхезия); нерегулярные маточные кровотечения; запоры или диарея; тошнота или рвота; чувство усталости/отсутствие энергии (анергия). Пять из вышеприведенных семи симптомов – «висцеральный синдром» встречался в 10 раз чаще у пациенток с эндометриозом. Наличие «висцерального синдрома» мы наблюдали в 32% случаев у женщин 1-A подгруппы и у 45% женщин 1-B подгруппы, и соответственно в 5% случаев в подгруппе 2-A и 20% женщин подгруппы 2-B.

С целью изучения молекулярных механизмов развития СХТБ у пациенток с ГЭ определяли экспрессию рецепторов эстрогенов (ER), прогестерона (PGR) и маркера пролиферации Ki-67 в эндометрии (ЭЭ). Для реализации поставленной цели методом случайной выборки, по основным параметрам (возраста, гинекологического и соматического анамнеза, наличия СХТБ) нами проанализированы морфологические образцы ЭЭ у 30 женщин из 3 групп. Среди исследуемых 30 наблюдений ЭЭ мы определили 19 случаев с гиперплазией без атипии (63,33%) и 13 случаев (37,78%) с нарушенной пролиферацией эндометрия, учитывая диагностические критерии классификации опухолей и предопухолевых процессов эндометрия ВОЗ [8]. Среди них в пользу гиперплазии без атипии свидетельствует: увеличение количества желез с изменением железисто-стромального соотношения более чем 1:1, различный размер и форма желез с разным количеством стромы между ними, уплотнение желез с формированием back-to-back скоплений, разнородный характер изменений: одни железы имеют нормальное строение, другие – с разветвлением и кистозной деформацией, эпителий – железистый стратифицированный с частыми фигурами митоза. Главной дифференциально-диагностической особенностью нарушенной пролиферации эндометрия является сохранение железисто-стромального соотношения менее 1:1 (рис. 1).

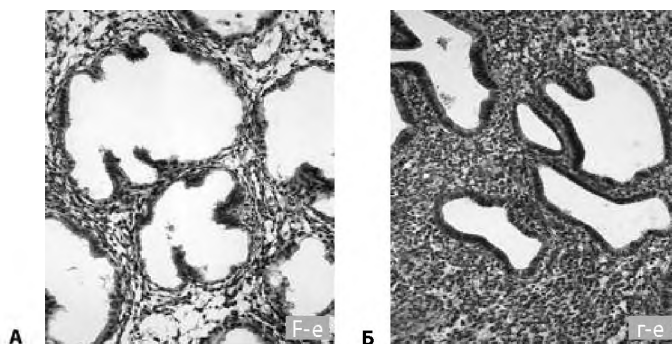


Рис. 1. Случай ЭЭ с гиперпластическими изменениями, окраска гематоксилином и эозином (400х): А – гиперплазия эндометрия без атипии. Б – нарушение пролиферации эндометрия

Таким образом, мы можем отметить, что гиперпластические изменения эндометрия, как железистая гиперплазия эндометрия без атипии, так и нарушение пролиферации эндометрия – ассоциируются с аденомиозом и синдромом хронической тазовой боли.

Одними из главных иммуногистохимических (ИГХ) характеристик пролиферации эндометрия является экспрессия антител к рецепторам стероидных гормонов эстрогеновых рецепторов (ER) и прогестероновых рецепторов (PGR) и индекса пролиферации (ИП) – Ki-67. Выраженная экспрессия ER встречалась в 8 случаях из 30 исследований (26,67%). В то же время можно отметить, что подавляющее большинство среди них составляли наблюдения с высокими показателями ВАШ (62,50%). Тогда как умеренная и низкая экспрессия маркера ER характеризовала только 3 случая: 2 из 8 (25,00%) и 1 из 8 (12,50%) соответственно. С другой стороны, противоположный характер распределения был отмечен для случаев с H-score менее 100: половина наблюдений с низкой экспрессией ER имела и низкий показатель уровня боли по ВАШ – 2 случая из 4 (50,00%) (табл. 2). Умеренная экспрессия ER встречается в большинстве исследуемых случаев – 18 из 30 (60,00%). Среди них умеренный и высокий уровень ВАШ был характерен примерно для одинакового количества наблюдений: 18 случаев – 9 (50,00%) и 8 (44,44%). В то время как выраженный болевой синдром наблюдался только в 1 случае (5,56%) с умеренной экспрессией ER (рис. 2).

В соответствии с вышеприведенными данными, мы можем указать следующие тенденции. Во-первых, в большинстве случаев экспрессия ER со значением H-score более 200 ассоциируется с выраженным болевым синдромом, а H-score от 100 до 200 – с выраженным или умеренно выраженным болевым синдромом по ВАШ. Во-вторых, в половине случаев с незначительным количеством рецепторов к эстрогенам в железах эндометрия (H-score < 100) жалобы на боль отсутствовали или имели несущественный характер. В нашем исследовании не было установлено статистически доказанной зависимости между уровнем ВАШ и повышенной экспрессией ER в строме ($p > 0,05$), хотя можно говорить о большей значимости высокой и умеренной функциональной активности желез на ER в распространении ЭЭ за внутренний слой матки с возникновением болевого синдрома (рис. 3).

Таблица 2
Характеристика экспрессии ER PGR в железах ЭЭ

Экспрессия ER	Уровень болевого синдрома по ВАШ			Всего	p*
	низкий	умеренный	высокий		
+	2	1	1	4	0,123
(H<100)	(50,00%)	(25,00%)	(25,00%)		
++	1	9	8	18	
(100<H <200)	(5,56%)	(50,00%)	(44,44%)		
+++	1	2	5	8	0,341
(200<H <300)	(12,50%)	(25,00%)	(62,50%)		
PGR	низкий	умеренный	высокий	Всего	p*
+	1	2	1	4	0,341
(H<100)	(25,00%)	(50,00%)	(25,00%)		
++	2	7	7	16	
(100<H <200)	(12,50%)	(43,75%)	(43,75%)		
+++	1	3	6	10	
(200<H <300)	(10,00%)	(30,00%)	(60,00%)		

Примечание: * достоверность различий при p<0,05.

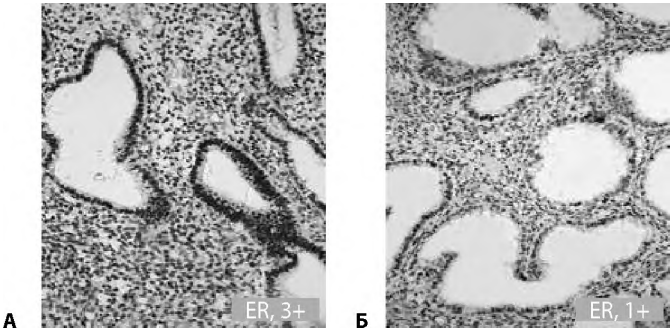


Рис. 2. Экспрессия ER в случаях ЭЭ с гиперпластическими изменениями, ИГХ-метод, дополнительная окраска гематоксилином (400х): А – высокая экспрессия ER в железах (H>200), Б – низкая экспрессия ER в железах (H<100)

Одной из главных характеристик экспрессии PGR в железах ЭЭ было практически полное соотношение с распределением по экспрессии ER, в том числе и наличие гетерогенного ее характера в обоих вариантах. Полученные данные H-score приведены в табл. 2. Нами было отмечено незначительное количество случаев с выраженной и умеренно выраженной экспрессией PGR в железах, по сравнению с ER: разница составила 2 случая из 30 (6,67%) в обеих группах соответственно. Относительно низкого индекса H-score: количество наблюдений одинаково для PGR и ER, о чем свидетельствует полное соотношение в этих случаях. То есть в тех 4 наблюдениях с низким уровнем экспрессии ER отмечался и низкий уровень индекса H-score PGR. Эта же тенденция сохранялась и для групп с умеренной и высокой экспрессией, кроме нескольких случаев, которые мы упоминали выше. На основании приведенных результатов можно предположить отсутствие зависимости с уровнем ВАШ, что подтверждено статистически (p>0,05). Хотя так же, как и для высокого и

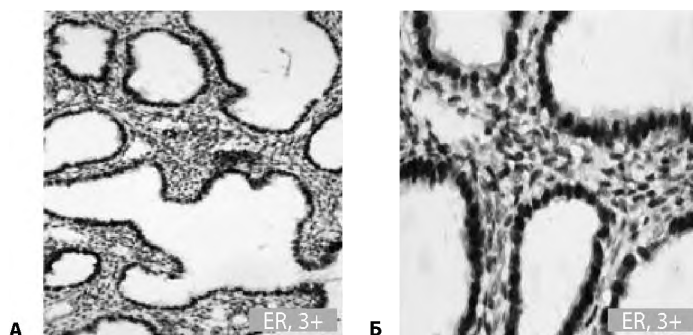


Рис. 3. Выраженная экспрессия ER в железах, по сравнению с низкой в строме, в случаях ЭЭ с гиперпластическими изменениями, ИГХ-метод, дополнительное окрашивание гематоксилином: А – 400х, Б – 1000х

умеренного индекса H-score ER, в группе с этими же показателями экспрессии PGR определялись значительно чаще высокие и умеренные уровни ВАШ соответственно.

Также выявлена особенность реакции стромы на экспрессию анти-тел к рецепторам стероидных гормонов. Если для ER мы отмечали в большинстве случаев значительную разницу между индексом H-score желез и стромы в пользу первых, то экспрессия PGR характеризовалась отсутствием такого преимущества. Экспрессия в строме была существенна (более 10%, что соответствует характеристике средней фазы пролиферации) меньше от этого показателя в железах в 9 случаях из 30 (30,00%), приблизительно соответствовала ему – в 14 случаях из 30 (46,67%) и была больше – в 7 случаях из 30 (23,33%). Данные сравнительного анализа в данном исследовании показали, что фактором для распространения эндометрия за внутренний слой матки является функциональная активация на PGR как желез, так и стромы в относительно равной степени (рис. 4).

В отношении пролиферативной активности стромы мы также наблюдали большую очаговую экспрессию. Так, минимальным и максимальным значениями Ki-67 в строме ЭЭ стали 5% и 21%. Необходимо заметить, что случаи с высокими показателями Ki-67 в строме имели высокие значения и ИП желез. Хотя в трех случаях (10,00%) мы наблюдали большую пролиферативную активность стромы, чем железистого эпителия (рис. 5).

Важной особенностью мы также считаем определение ассоциации высоких значений ИП в железах и строме с высокой экспрессией ER и PGR. Так, среди 12 случаев 30 (40%) со значением ИП желез выше 20% мы наблюдали высокие и умеренные индексы H-score ER и PGR в 10 случаях (83,33%). Но необходимо отметить отсутствие такого «полного» соотношения между экспрессией последних и Ki-67, как между ER и PGR напрямую. Об этом свидетельствуют 8 случаев из 30 (26,67%) с высокими показателями Ki-67 и низким или умеренным индексом H-score ER и PGR и наоборот.

Большинство наблюдений с ИП более 20% в железах характеризовалось высоким ВАШ – 8 из 12 случаев (66,67%). Однако справедливым

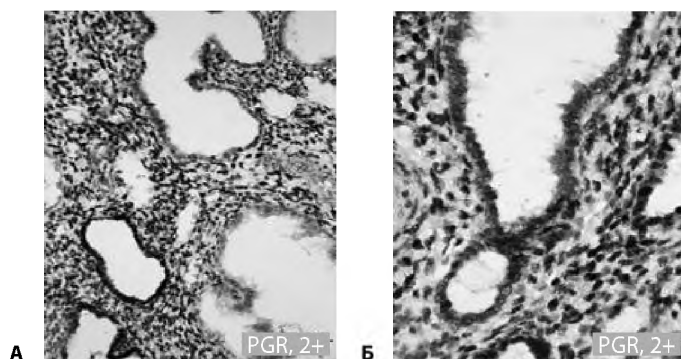


Рис. 4. Экспрессия PGR в железах в случаях ЭЭ с гиперпластическими изменениями, ИГХ-метод, дополнительное окрашивание гематоксилином, 1000х: А – высокая пролиферативная активность; Б – низкая пролиферативная активность

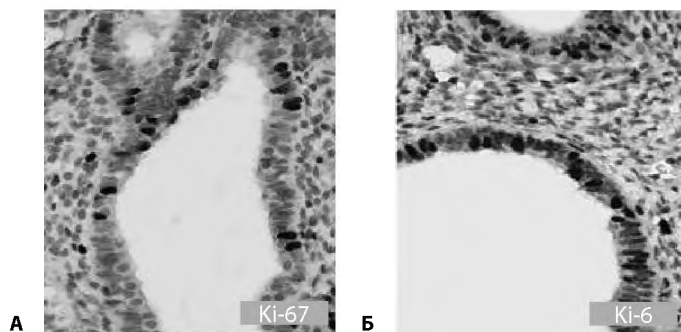


Рис. 5. Экспрессия Ki-67 в железах и в строме в случаях ЭЭ с гиперпластическими изменениями, ИГХ-метод, дополнительное окрашивание гематоксилином, 400х: А – гетерогенный характер окрашивания желез, низкая пролиферативная активность стромы; Б – гетерогенный характер окрашивания желез, высокая пролиферативная активность

будет указать на наличие наблюдений с высоким уровнем болевого синдрома и низким показателем Ki-67 – 5 случаев из 30 (16,67%). При исследовании стромы ЭЭ мы можем отметить такие же особенности экспрессии показателя пролиферативной активности Ki-67. Таким образом, мы видим прямую зависимость: чем больше значение Ki-67, тем больше уровень болевого синдрома по ВАШ при наличии аденомиоза. Эта связь была подтверждена статистически как прямая слабой силы зависимость ($r=0,041$, $p<0,05$ – для желез, тогда как для ИП стромы и ВАШ установлено $r=0,092$, $p>0,05$).

■ ВЫВОДЫ

Морфологическая характеристика эутопического эндометрия у женщин с синдромом хронической тазовой боли включает в себя гиперпластические изменения (нарушение пролиферации и гиперплазии без атипии), повышение уровня экспрессии Ki-67 ($p<0,05$). Тканевая

гиперэстрогения и повышенный инвазивный потенциал создают «благоприятные» условия для распространения ЭЭ за внутренний слой матки с возникновением болевого синдрома, а именно высокой и умеренной функциональной активности желез на ER и функциональной активности на PGR как желез, так и стромы в относительно равной степени. Сравнительный анализ подгрупп позволил определить некоторые тенденции и обнаружил статистически достоверные зависимости ($p < 0,05$), что обуславливает необходимость дальнейшего продолжения исследований с целью определения статистически значимых предикторных критериев формирования СХТБ.

Таким образом, исследование статуса эутопического эндометрия у пациенток с СХТБ, с одной стороны, позволит определить диагностическую и патогенетическую роль изменений в нем при формировании ХТБ, а с другой, улучшить понимание патогенеза развития аденомиоза и наружного эндометриоза как причин возникновения тазовой боли.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Guriev T., Sidorova I., Unanyan A. (2012) *Sochetanie miomi i adenomioza* [Combination of myoma and adenomyosis]. M: MIA, pp. 13–39.
2. Tatarchuk T., Zaharenko F., Tutchenko T. (2013) *Novie podhodi k problemnim voprosam lecheniya genital'nogo endometrioza* [New approaches to problematic issues of treatment of genital endometriosis]. *Reproduktivnaya endokrinologiya*, vol. 3 (11), pp. 36–42.
3. Kerivnitstvo Korolivs'kogo koledzhu akusherstva i ginekologii Velikobritanii (2012) *Terapiya hronichnogo tazovogo bolyu u zhinok, yaki vpershe zvernulis' po medichnu dopomogu* [Therapy of chronic pelvic pain in women, who first applied for medical care]. Druge vidannya. Royal College of Midwives (RCM); Women's Health Pharmacist Group.
4. Maksimova YU. (2010) *Kliniko-morfologicheskaya harakteristika izmenenii eutopicheskogo i ektopicheskogo endometriya pri rasprostranennih formah genital'nogo endometrioza* [Clinical and morphological characteristics of the changes of eutopic and ectopic endometrium in common forms of genital endometriosis] (PhD Thesis). M., 16 p.
5. Chernuha G. (2011) *Endometrioz i hronicheskaya tazovaya bol': prichini i posledstviya* [Endometriosis and chronic pelvic pain: causes and consequences]. *Problemi reproduksii*, 5, pp. 83–89.
6. Chin M.L., Fillingim R.B., Ness T.J. (2013) *Pain in Women*. Oxford University Press, 334 p.
7. Hansen K.E., Kesmodel U.S., Baldursson E.B., Kold M., Forman A. (2014) Visceral syndrome in endometriosis patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 179, pp. 198–203.
8. Kurman R.J., Norris H.J. (1995) *Endometrial hyperplasia and related cellular changes*. Blaustein's pathology of the female genital tract, 5th ed. New York, pp. 411–437.
9. Kaya S., Hermans L., Willems T. (2013) Central sensitization in urogynecological chronic pelvic pain: a systematic literature review. *Pain Physician.*, vol. 16, no 4, pp. 291–308.
10. Baranowski A., Abrams P., Berger R.E. (2008) Urogenital pain-time to accept a new approach to phenotyping and, as a consequence, management. *European urology*, vol. 53, no 1, pp. 33–36.